

PCT/JP00/06802  
29.09.00

日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 13 OCT 2000

WIPO PCT

JP00/6802

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年10月 1日

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第281843号

出願人

Applicant(s):

中外製薬株式会社

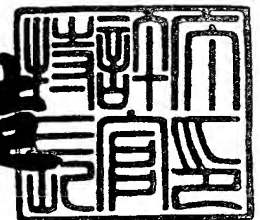
PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 8月25日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3067111

【書類名】 特許願

【整理番号】 994123

【提出日】 平成11年10月 1日

【あて先】 特許庁長官 近藤 隆彦 殿

【国際特許分類】 A01K 67/027

【発明の名称】 持続的凝固亢進動物モデル及びその作製方法

【請求項の数】 8

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社  
社内

【氏名】 斉藤 浩之

【特許出願人】

【識別番号】 000003311

【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100077517

【弁理士】

【氏名又は名称】 石田 敬

【電話番号】 03-5470-1900

【選任した代理人】

【識別番号】 100092624

【弁理士】

【氏名又は名称】 鶴田 準一

【選任した代理人】

【識別番号】 100087871

【弁理士】

【氏名又は名称】 福本 積

【選任した代理人】

【識別番号】 100082898

【弁理士】

【氏名又は名称】 西山 雅也

【選任した代理人】

【識別番号】 100081330

【弁理士】

【氏名又は名称】 樋口 外治

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 036135

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9814920

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 持続的凝固亢進動物モデル及びその作製方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヒト組織因子 (TF) 又はその一部分をコードする遺伝子が挿入されていて該遺伝子を発現することができる動物細胞が移植されている実験動物であって、血液凝固亢進状態が長期間持続する非ヒト動物。

【請求項 2】 前記ヒト組織因子の一部が、細胞内領域を欠くヒト組織因子である、請求項 1 に記載の動物。

【請求項 3】 前記動物細胞が哺乳動物細胞である、請求項 1 又は 2 に記載の動物。

【請求項 4】 前記哺乳動物細胞がヒト骨髓腫細胞である、請求項 3 に記載の動物。

【請求項 5】 前記動物が、マウスである、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の動物。

【請求項 6】 前記血液凝固亢進状態が、ヒト組織因子血中濃度の上昇、血小板の減少、フィブリノーゲンの減少、可溶性フィブリンモノマー複合体濃度の上昇及びトロンビン-アンチトロンビン III 複合体濃度の上昇の少なくとも 1 つの現象により表わされる、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の動物。

【請求項 7】 請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の動物の作製方法において、ヒト組織因子 (TF) 又はその一部分をコードする遺伝子が挿入されており該遺伝子を発現することができる動物細胞を非ヒト実験動物に移植し、そして血液凝固亢進状態が持続する動物を選択することを特徴とする方法。

【請求項 8】 請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の動物を用いることを特徴とする抗血栓薬のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、持続的血液凝固亢進動物モデル、及びその作製方法に関する。

【0002】

## 【従来 of 技術】

血液凝固反応はセリンプロテアーゼ前駆体が次々に活性型プロテアーゼにより活性化されて、最終的にトロンビンが生成することでフィブリン形成される反応である。血栓症は、各種の病的状態の進展に伴い血漿中の凝固・線溶系の変化、血小板や白血球、血管内皮細胞の機能が変化することで血液凝固反応が開始され過剰に亢進した結果として生じる。血液凝固反応の開始因子が組織因子である。急性心筋梗塞や不安定狭心症などの急性冠動脈症候群では、動脈硬化が進展した結果生じたプラーク内に多く存在する組織因子がプラークの破綻にともなって血液に露出することで血液凝固反応が開始される。

## 【0 0 0 3】

また、敗血症や悪性腫瘍に随伴して生じる播種性血管内凝固症候群では、活性化された単球やマクロファージなどが組織因子を発現したり腫瘍細胞が組織因子を発現することで血液凝固反応を亢進させている。一旦、組織因子が血液に接触すると血液凝固反応は短時間の内に進み血栓を生成する。従って、血栓形成を予防するためには何時開始されるか分からない、あるいは常に生じている血液凝固反応を阻止する必要がある。従って、有効な抗血栓薬の開発には、持続的に凝固亢進状態を示す実験モデルが不可欠である。しかしながら、一般に知られている血栓モデルはいずれも短時間で血栓形成を誘発するモデルである。

## 【0 0 0 4】

## 【発明が解決しようとする課題】

そこで、ヒト組織因子を持続的に血液に接触させることで凝固亢進状態が持続する実験モデルを提供しようとするものである。

## 【0 0 0 5】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記の課題を解決すべく種々検討を行った結果、ヒト組織因子(TF)遺伝子を導入することによりヒト組織因子を持続的に産生することができる動物細胞を実験動物に移植して動物中のヒト組織因子濃度を上昇せしめることにより、該動物における血液凝固亢進状態を長期間維持することができることを見出し、本発明を完成した。

## 【0006】

従って本発明は、ヒト組織因子（TF）又はその一部分をコードする遺伝子が挿入されていて該遺伝子を発現することができる動物細胞が移植されている実験動物であって血液凝固亢進状態が長期間持続する非ヒト動物を提供する。

本発明はまた、前記の実験モデル動物の作製方法において、ヒト組織因子（TF）又はその一部分をコードする遺伝子が挿入されており該遺伝子を発現することができる動物細胞を非ヒト実験動物に移植し、そして血液凝固亢進状態が持続する動物を選択することを特徴とする方法を提供する。

本発明はまた、前記の動物を用いることを特徴とする抗血栓薬のスクリーニング方法を提供する。

## 【0007】

## 【発明の実施の形態】

本発明において使用するためのヒト組織因子（TF）をコードする遺伝子はすでにクローニングされており、その塩基配列及びそれによりコードされるアミノ酸配列も知られている（H. Morrisseyら、Cell, Vol. 50, p.129-135 (1987)）。全長ヒト組織因子をコードする塩基配列及び対応するアミノ酸配列を配列番号：1及び2に示す。本発明においては、例えば細胞内領域が除去されたTFをコードする遺伝子でもよく、また血液凝固系を開始する活性を維持している部分をコードする遺伝子でもよい。

## 【0008】

この遺伝子を動物細胞に導入し発現せしめるためのベクターとしては、動物細胞において機能する任意の発現ベクターを使用することができ、例えば pCOS1, pSV2-neo, pMAM-neo, pSG5などを用いることができる。本発明では哺乳類細胞で常用される有用なプロモーター、ヒトTF遺伝子、その3'側下流にポリAシグナルを機能的に結合させて発現させることができる。例えば、プロモーター／エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウィルス前期プロモーター／エンハンサー（human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer）や、レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス40（SV40）等のウィルスプロモーター、あるいはヒトエロ

ンゲーションファクター 1  $\alpha$  (HEF1 $\alpha$ ) などの本有類細胞由来のプロモーター／エンハンサー等が挙げられる。発現ベクターには複製起源として、SV40、ポリオマウイルス、アデノウイルス等の由来のものを用いることができ、さらに選択マーカーとして、ホスホトランスフェラーゼAPH(3') IIまたはI (neo) 遺伝子、チミジンキナーゼ(TK) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR) 遺伝子等を含むことができる。

【0009】

また、細胞への遺伝子導入方法は、エレクトロポレーション法その他、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等を用いることができる。この発現ベクターを導入するための細胞としては、実験動物に移植可能なものであれば特に限定されない。このためには種々の培養細胞を使用することができ、例えば哺乳類細胞、例えばヒト、マウス、ラット、ハムスター、モンキー等由来の培養細胞、特に腫瘍細胞が好ましい。細胞の具体例としては、KPMM2, ARH-77などのヒト骨髓腫細胞株、P815, P388, L1210などの白血病細胞株等が使用できる。

【0010】

本発明において使用する実験動物は、ヒト以外の哺乳類であり、好ましくは実験用小動物、例えばマウス、ラット、ハムスター等であり、マウスが特に好ましい。

【0011】

#### 【実施例】

次に、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

#### 実施例 1 実験用マウスの作製

ヒト組織因子をコードする遺伝子(配列番号: 1)を動物細胞用発現ベクターpCOS1に挿入したベクターhTF-pCOS1を制限酵素PvuIで消化し、直鎖にしたものをヒト骨髓腫細胞株KPMM2(FERM P-14170)にエレクトロポレーションにより導入した。

【0012】

なお、発現ベクターpCOS1はHEF-PMh-g $\gamma$  1(WO92/1

9759参照) から、EcoR1およびSma1消化により抗体遺伝子を削除し、EcoR1-NotI-BamH1 Adaptor (宝酒造) を連結することにより構築した。

前記ヒト組織因子遺伝子を導入したヒト骨髓腫細胞株を、2mg/mLのG418を含有するRPMI1640 (20%FCS, hIL-6:4ng含有) 培地に培養し、増殖してきた細胞について、抗ヒト組織因子抗体 (American Diagnostica) を用いて、ヒト組織因子を発現する細胞をフローサイトメトリーにより確認した。これにより、ヒト組織因子遺伝子を導入した細胞株KPM2/TF226を得た。

#### 【0013】

前記ヒト組織因子遺伝子を導入する前の親株 (KPM2/parent) 及び遺伝子を挿入した株KPM2/TF226を、4ng/mLのヒトIL-6及び20%ウシ胎児血清を含むRPMI-1640において培養した。こうして増殖させたKPM2/TF226細胞及び親株KPM2/parent細胞を別々のSCIDマウス (日本クレア、雄、7週齢、体重平均約22g) の側腹部の皮下に $1 \times 10^7$  個移植し、経時的に、腫瘍体積、血液中のヒト組織因子濃度、血小板数、フィブリノーゲン濃度、可溶性フィブリンモノマー複合体濃度、及びトロンビン-アンチトロンビンIII 複合体濃度の変化を調べた。

#### 【0014】

この結果、図1に示す通り、いずれのマウスにおいても腫瘍体積は経時的に増加した。しかしながら、図2に示す通り、ヒト組織因子の血中濃度は、ヒト組織因子遺伝子が導入された細胞を移植したマウスにおいては経時的に上昇したが、該遺伝子が導入されていない細胞を移植したマウスにおいては全く上昇しなかった。また、図3及び図4に示す通り、ヒト組織因子遺伝子が導入された細胞を移植したマウスにおいては、それぞれ血小板及びフィブリノーゲンが経時的に減少し、これらの血液凝固成分が消耗されたことが示された。これに対して、ヒト組織因子遺伝子が導入されていない細胞を移植したマウスにおいては、これらの血液凝固成分の減少 (消耗) は生じなかった。

#### 【0015】



また、図 5 及び図 6 に示す通り、それぞれ可溶性フィブリンモノマー複合体（s FMC）及びトロンビン-アンチトロンビンIII 複合体（TAT）の血中濃度は、ヒト組織因子遺伝子が導入された細胞を移植したマウスにおいては経時的に上昇し、血液凝固亢進状態が進行していることが示された。これに対して、ヒト組織因子遺伝子が導入されていない細胞を移植したマウスにおいては、前記の血液凝固-関連成分濃度の上昇は見られなかった。

以上の結果、ヒト組織因子遺伝子が導入された細胞を移植したマウスにおいては、血液凝固亢進状態が長期間持続していることが確認され、本発明の動物が、持続的凝固亢進モデル動物として有用であることが確認された。

【0 0 1 6】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Animal model for sustained coagulation stimulatory state

<130> 994123

<160> 2

<210> 1

<211> 888

<212> DNA

<213> Homosapiens

<220>

<223> DNA coding for human TF

<400> 1

atg gag acc cct gcc tgg ccc cgg gtc ccg cgc ccc gag acc gcc gtc 48

Met Glu Thr Pro Ala Trp Pro Arg Val Pro Arg Pro Glu Thr Ala Val

-30

-25

-20

gct cgg acg ctc ctg ctc ggc tgg gtc ttc gcc cag gtg gcc ggc gct 96

Ala Arg Thr Leu Leu Leu Gly Trp Val Phe Ala Gln Val Ala Gly Ala

-15

-10

-5

-1

tca ggc act aca aat act gtg gca gca tat aat tta act tgg aaa tca 144

Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser

1

5

10

15

act aat ttc aag aca att ttg gag tgg gaa ccc aaa ccc gtc aat caa 192

Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln

20

25

30

gtc tac act gtt caa ata agc act aag tca gga gat tgg aaa agc aaa 240

Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys

35

40

45

tgc ttt tac aca aca gac aca gag tgt gac ctc acc gac gag att gtg	288
Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val	
50 55 60	
aag gat gtg aag cag acg tac ttg gca cgg gtc ttc tcc tac ccg gca	336
Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala	
65 70 75 80	
ggg aat gtg gag agc acc ggt tct gct ggg gag cct ctg tat gag aac	384
Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn	
85 90 95	
tcc cca gag ttc aca cct tac ctg gag aca aac ctc gga cag cca aca	432
Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr	
100 105 110	
att cag agt ttt gaa cag gtg gga aca aaa gtg aat gtg acc gta gaa	480
Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu	
115 120 125	
gat gaa cgg act tta gtc aga agg aac aac act ttc cta agc ctc cgg	528
Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg	
130 135 140	
gat gtt ttt ggc aag gac tta att tat aca ctt tat tat tgg aaa tct	576
Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser	
145 150 155 160	
tca agt tca gga aag aaa aca gcc aaa aca aac act aat gag ttt ttg	624
Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu	
165 170 175	
att gat gtg gat aaa gga gaa aac tac tgt ttc agt gtt caa gca gtg	672
Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val	
180 185 190	

att ccc tcc cga aca gtt aac cgg aag agt aca gac agc ccg gta gag 720

Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu

195

200

205

tgt atg ggc cag gag aaa ggg gaa ttc aga gaa ata ttc tac atc att 768

Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Ile Phe Tyr Ile Ile

210

215

220

gga gct gtg gta ttt gtg gtc atc atc ctt gtc atc atc ctg gct ata 816

Gly Ala Val Val Phe Val Val Ile Ile Leu Val Ile Ile Leu Ala Ile

225

230

235

240

tct cta cac aag tgt aga aag gca gga gtg ggg cag agc tgg aag gag 864

Ser Leu His Lys Cys Arg Lys Ala Gly Val Gly Gln Ser Trp Lys Glu

245

250

255

aac tcc cca ctg aat gtt tca taa 888

Asn Ser Pro Leu Asn Val Ser \*\*\*

260

【 0 0 1 7 】

<210> 2

<211> 295

<212> PRT

<220>

<223> Amino acid sequence of human TF

<400> 2

Met Glu Thr Pro Ala Trp Pro Arg Val Pro Arg Pro Glu Thr Ala Val

-30

-25

-20

Ala Arg Thr Leu Leu Leu Gly Trp Val Phe Ala Gln Val Ala Gly Ala

-15

-10

-5

-1

Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser

1

5

10

15

Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln  
 20 25 30  
 Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys  
 35 40 45  
 Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val  
 50 55 60  
 Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala  
 65 70 75 80  
 Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn  
 85 90 95  
 Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr  
 100 105 110  
 Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu  
 115 120 125  
 Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg  
 130 135 140  
 Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser  
 145 150 155 160  
 Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu  
 165 170 175  
 Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val  
 180 185 190  
 Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu  
 195 200 205  
 Cys MET Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Ile Phe Tyr Ile Ile  
 210 215 220  
 Gly Ala Val Val Phe Val Val Ile Ile Leu Val Ile Ile Leu Ala Ile  
 225 230 235 240

特平 1 1 - 2 8 1 8 4 3

Ser Leu His Lys Cys Arg Lys Ala Gly Val Gly Gln Ser Trp Lys Glu

245

250

255

Asn Ser Pro Leu Asn Val Ser

260

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、ヒト組織因子遺伝子が導入された細胞を移植したマウス（点線）及び該遺伝子が導入されていない細胞を移植したマウス（実線）における腫瘍体積の、腫瘍細胞移植後の経時変化を示すグラフである。

【図 2】

図 2 は、ヒト組織因子遺伝子が導入された細胞を移植したマウス（点線）及び該遺伝子が導入されていない細胞を移植したマウス（実線）における、ヒト組織因子の血中濃度の、腫瘍細胞移植後の経時変化を示すグラフである。

【図 3】

図 3 は、ヒト組織因子遺伝子が導入された細胞を移植したマウス（点線）及び該遺伝子が導入されていない細胞を移植したマウス（実線）における、血小板の数の、腫瘍細胞移植後の経時変化を示すグラフである。

【図 4】

図 4 は、ヒト組織因子遺伝子が導入された細胞を移植したマウス（点線）及び該遺伝子が導入されていない細胞を移植したマウス（実線）における、フィブリノーゲンの血中濃度の、腫瘍細胞移植後の経時変化を、腫瘍細胞を移植していない対照マウス（Normal）におけるフィブリノーゲンの濃度を 100%とした相対値として示すグラフである。

【図 5】

図 5 は、ヒト組織因子遺伝子が導入された細胞を移植したマウス（点線）及び該遺伝子が導入されていない細胞を移植したマウス（実線）における、可溶性フィブリンモノマー複合体（sFMC）の血中濃度の、腫瘍細胞移植後の経時変化を示すグラフである。

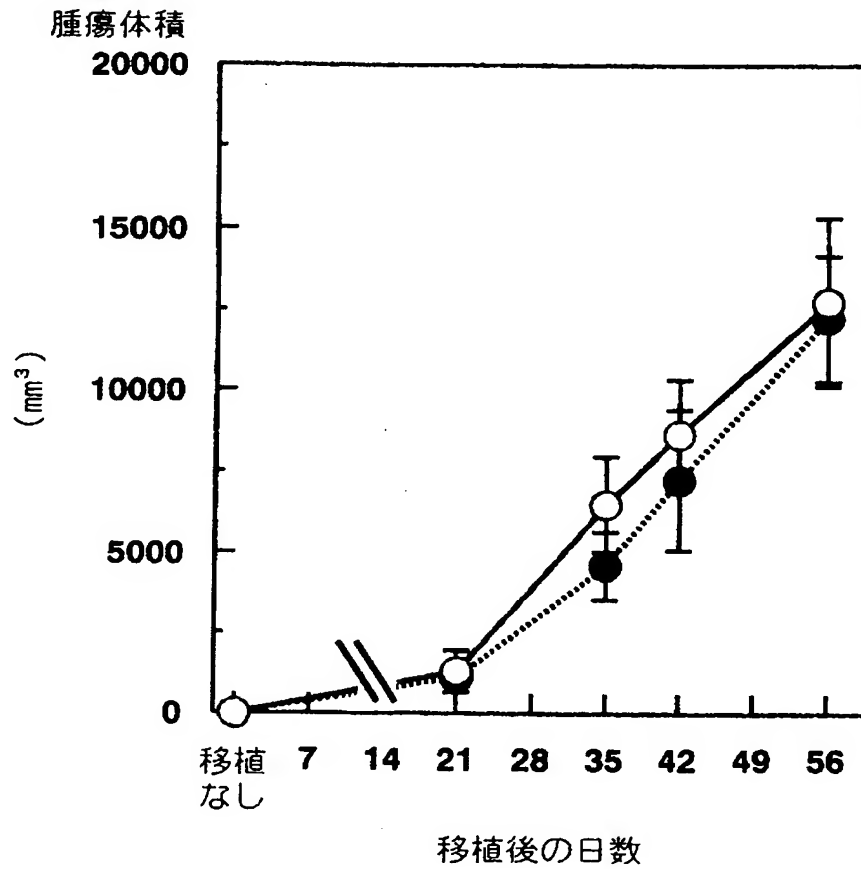
【図 6】

図 6 は、ヒト組織因子遺伝子が導入された細胞を移植したマウス（点線）及び該遺伝子が導入されていない細胞を移植したマウス（実線）における、トロンビン-アンチトロンビンIII 結合複合体（TAT）の血中濃度の、腫瘍細胞移植後の経時変化を示すグラフである。

【書類名】 図面

【図 1】

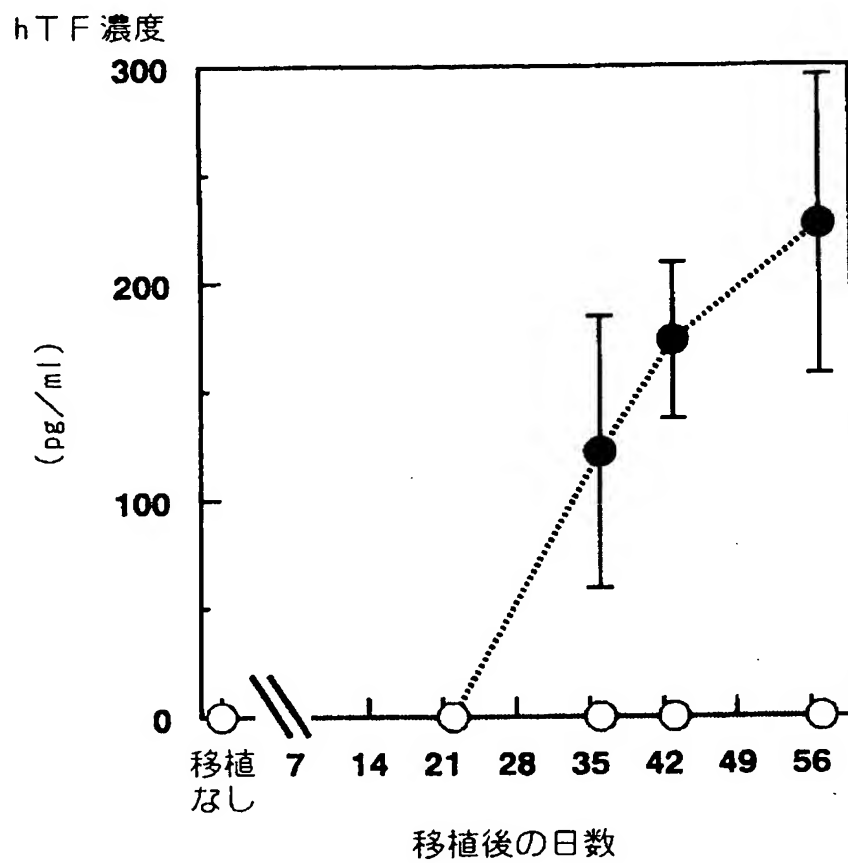
図 1





【図 2】

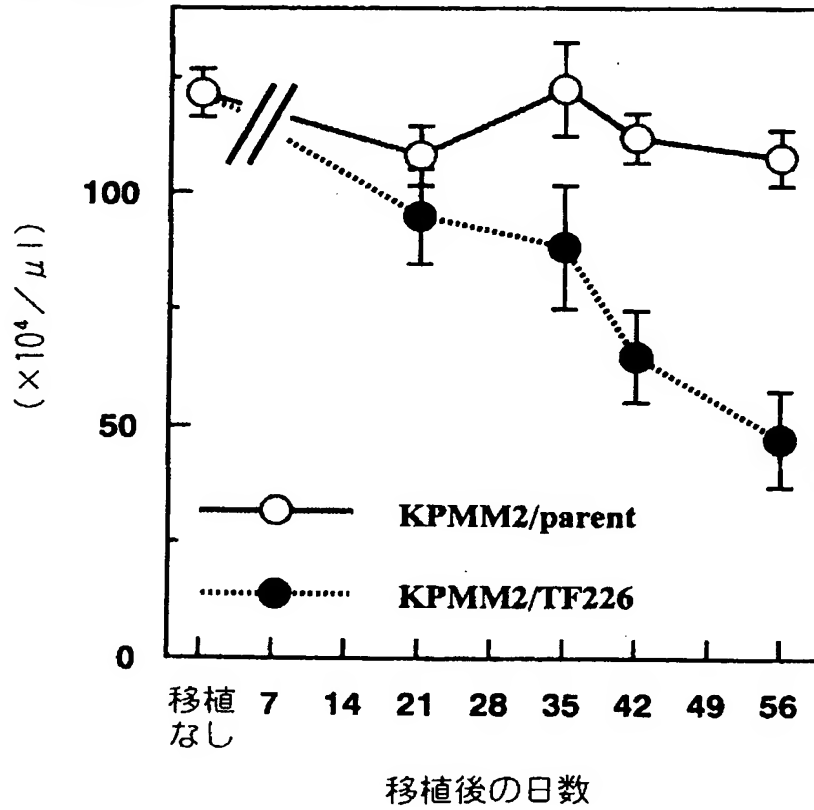
図 2



【図 3】

図 3

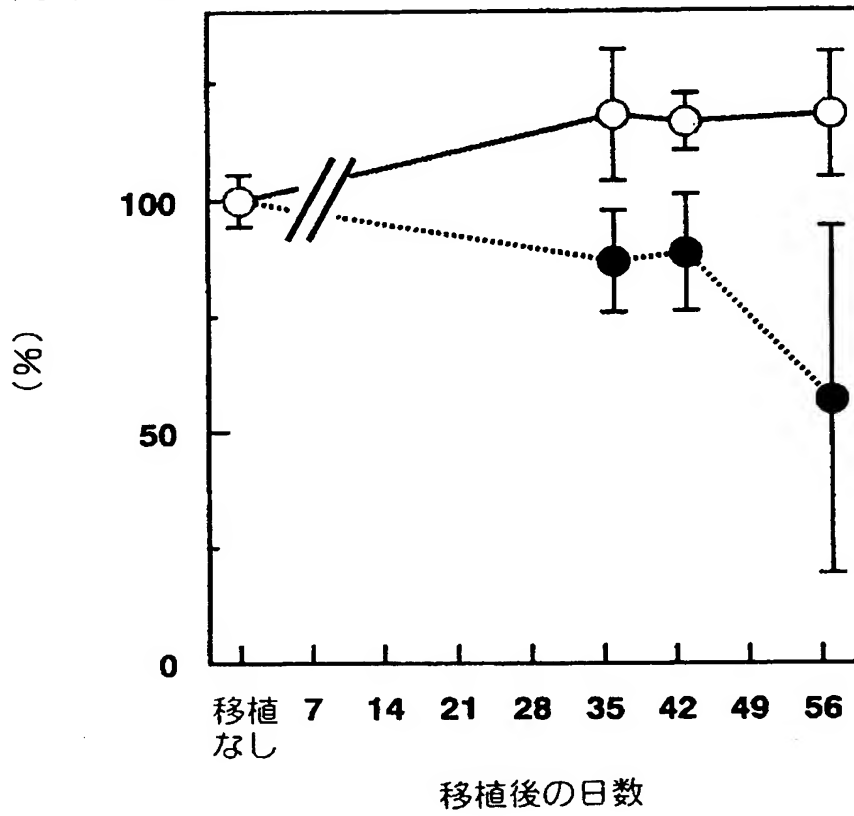
血小板数



【図 4】

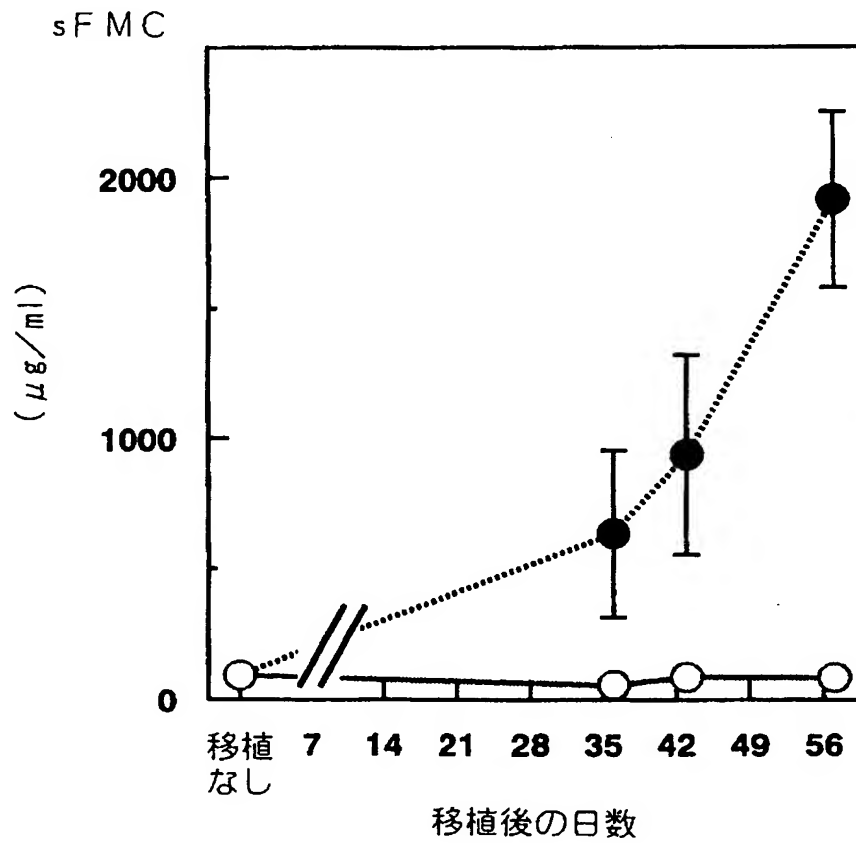
図 4

フィブノーゼン



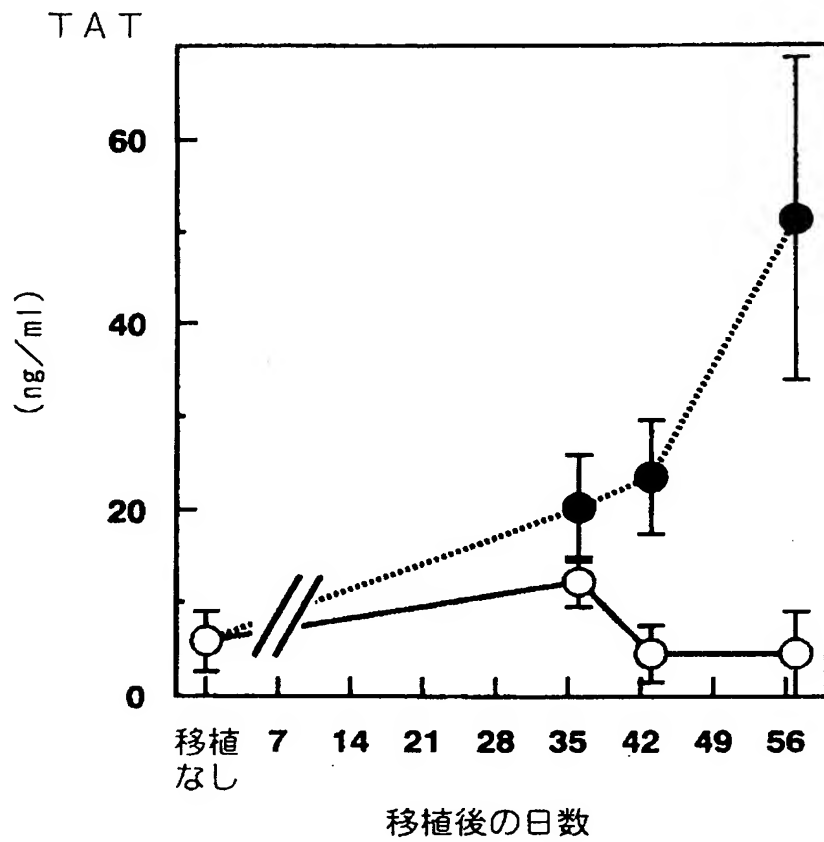
【図 5】

図 5



【図 6】

図 6



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 血液凝固亢進状態が持続する実験動物モデルの提供。

【解決手段】 ヒト組織因子遺伝子が導入された細胞、例えば腫瘍細胞を、マウスなどの実験動物に移植して増殖させることにより、ヒト組織因子を持続的に該実験動物に供給することによって、血液凝固亢進状態が持続している動物を提供する。この動物モデルは、血液凝固亢進状態が持続する疾患の治療剤の開発研究などに有用である。

【選択図】 図 5

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000003311]

1. 変更年月日	1990年 9月 5日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都北区浮間5丁目5番1号
氏 名	中外製薬株式会社

